



隨身課堂

《药物分析》

高效液相色谱法

药学系 药学教研室 刘燕老师



学习目标

1. 掌握高效液相色谱法的概念、原理。
2. 熟悉岛津LC-10A高效液相色谱仪的操作步骤及注意事项。
3. 能进行药物含量测定的计算。



主要内容

- 一、色谱法的分类
- 二、高效液相色谱法
- 三、高效液相色谱仪
- 四、高效液相色谱仪操作规程



一、色谱法的分类

色谱法（又称层析法）

是利用不同物质在不同的**两相**（固定相和流动相）中所表现的物理化学性质上差异来进行分离、分析的方法。

分离原理是

溶于**流动相**中的**各组分**经过**固定相**时，由于与固定相发生作用（吸附、分配、离子吸引、排阻、亲和）的大小、强弱不同，在固定相中**滞留时间不同**，从而**先后**从固定相中**流出**。

色谱法的**分类方法**有很多种（按两相的状态分、按分离机理分，按固定相的性质分）



一、色谱法的分类

（一）按固定相的性质分类

1. 纸色谱法

2. 柱色谱法

3. 薄层色谱法：主用于药物的鉴别和有关物质的限制度检查

（二）按两相的状态分类

1. 气相色谱法

2. 液相色谱法（**高效液相色谱法**应用最广）

均主用于药物的有关物质定量检查和含量测定



一、色谱法的分类

高效液相色谱法：系采用**高压**输液**泵**将规定的流动相泵入装有填充剂的色谱柱，对供试品进行分离测定的色谱方法。

（以高压输出的液体为流动相的色谱技术）

High **P**erformance **L**iquid **C**hromatograph



HPLC



二、高效液相色谱法

(一) HPLC的特点 (三高一广一快)

(1) **高压**

(2) **高效**：分离效能**高**：柱效用**理论塔板数**表示。

高效： $2 \times 10^3 \sim 4 \times 10^4 \text{m}^{-1}$ ；经典： $2 \sim 50 \text{m}^{-1}$ ，气相： 10^3m^{-1}

(3) **高灵敏度**：紫外检测器灵敏度可达 $0.01 \mu\text{g}$ 。

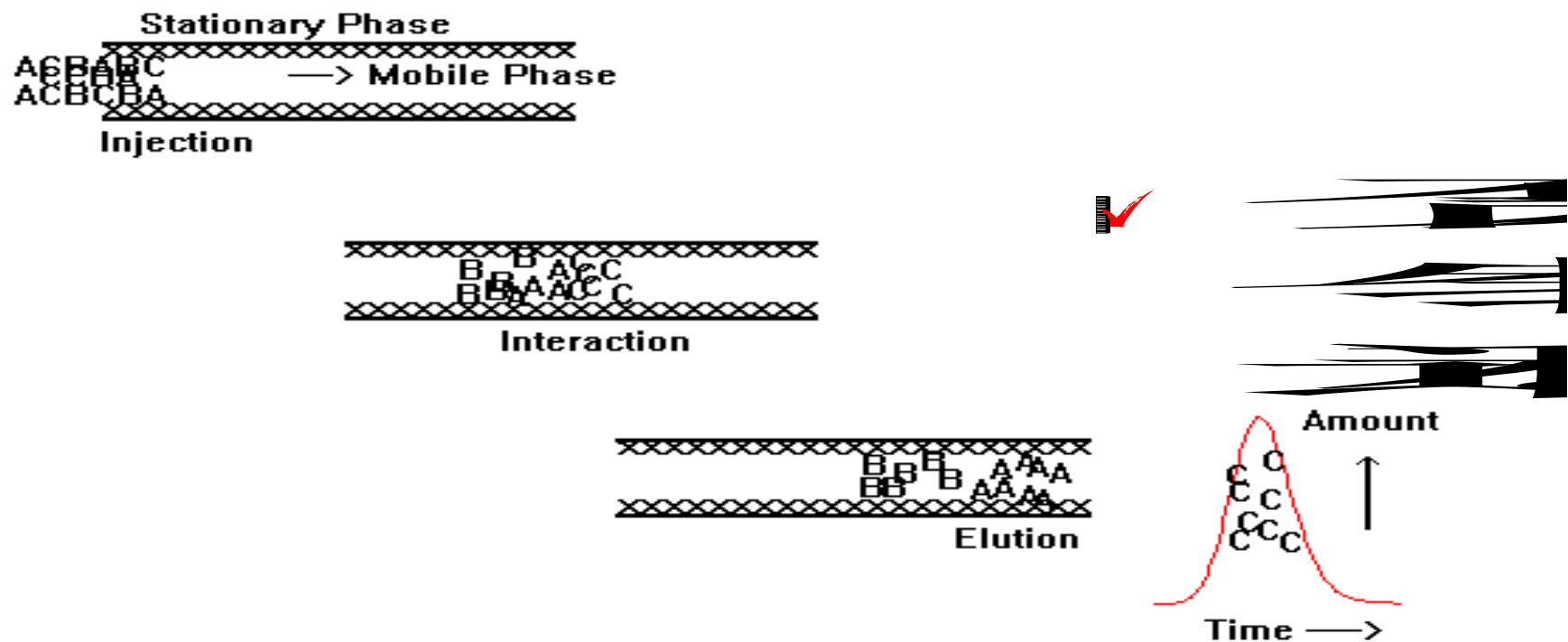
(4) 适用范围**广**：适用于挥发性低、热稳定性差、分子量大的高分子化合物，且该物质溶解后能制成溶液样品，占**有机物的80%以上**。

(5) 分析速度**快**：流速为 $0.1 \sim 10.0 \text{ ml/min}$



二、高效液相色谱法

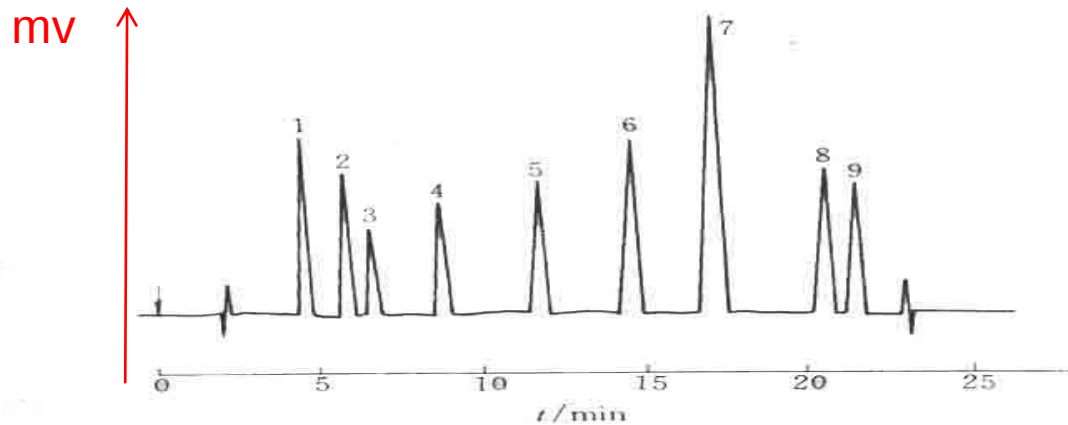
(二) HPLC分离的机理



二、高效液相色谱法

(三) 高效液相色谱法的相关概念

1. **色谱图**：样品流经色谱柱和检测器，所得到的**信号 - 时间**曲线，又称色谱流出曲线。



反相离子对色谱分离水溶性维生素

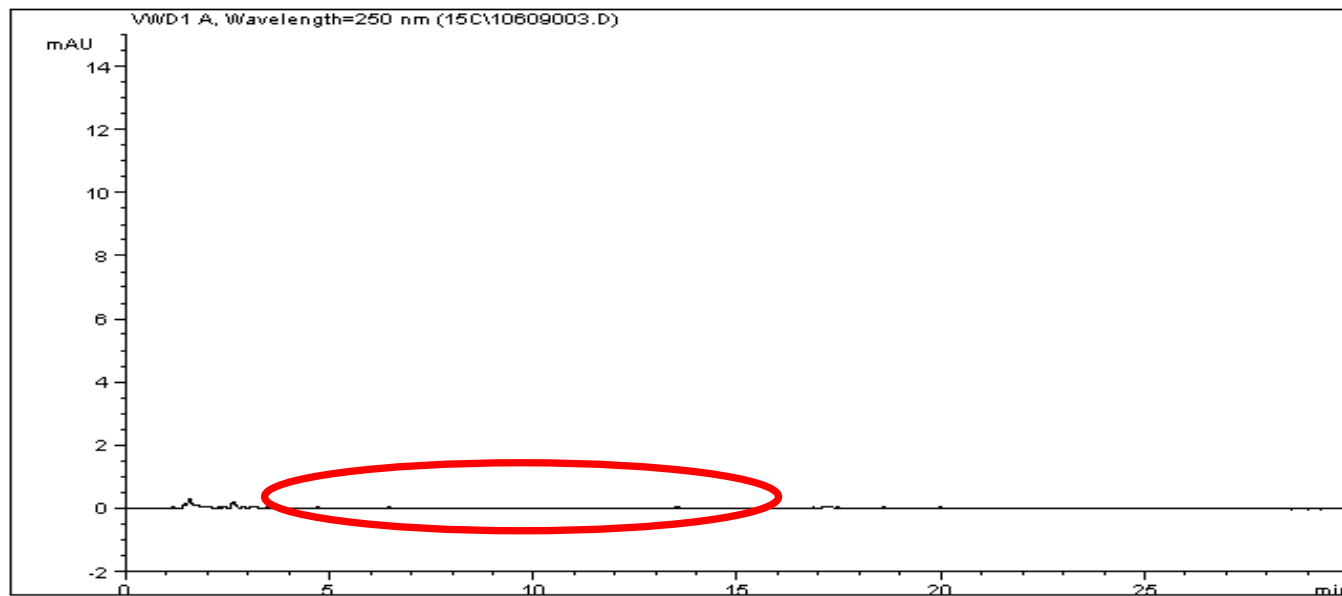
1—维生素 C；2—维生素 B₁；3—维生素 B₆；4—烟酸；5—维生素 K₃（亚硫酸氢钠甲基萘醌）；6—烟酰胺；7—对羟基苯甲酸；8—维生素 B₁₂；9—维生素 B₂

由电信号强度对时间作图所绘制的曲线



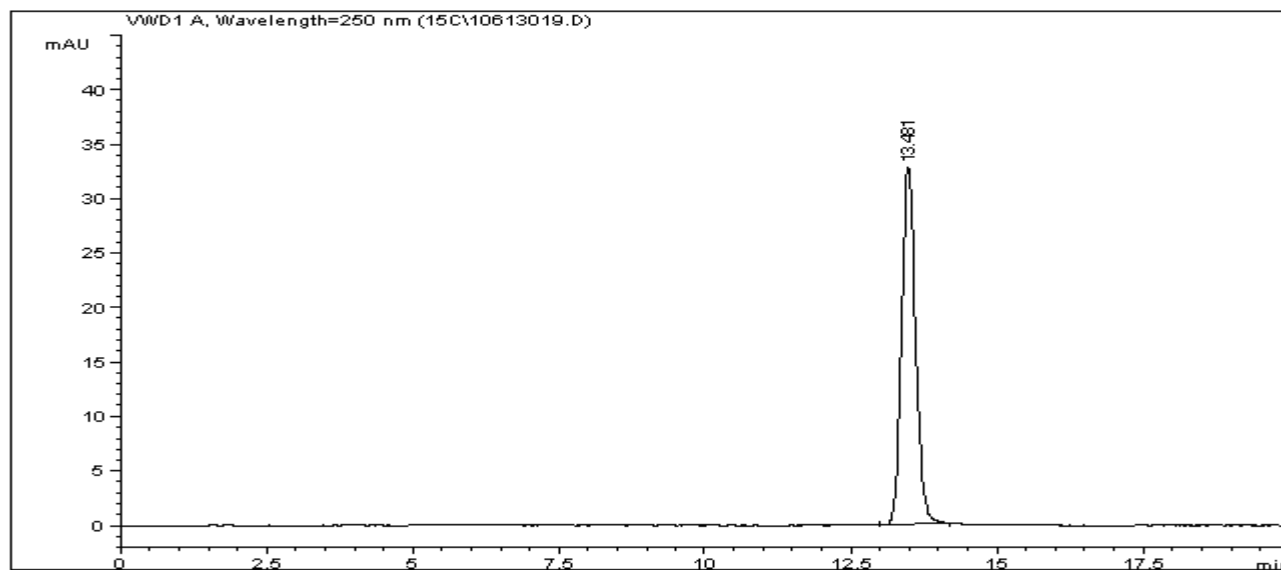
(三) 高效液相色谱法相关概念

2. 基线 (base line) --在操作条件下**没有组分流出**的流出曲线。用流动相冲洗，柱与流动相达到平衡后，检测器测出一段时间的流出曲线。一般应平行于时间轴。

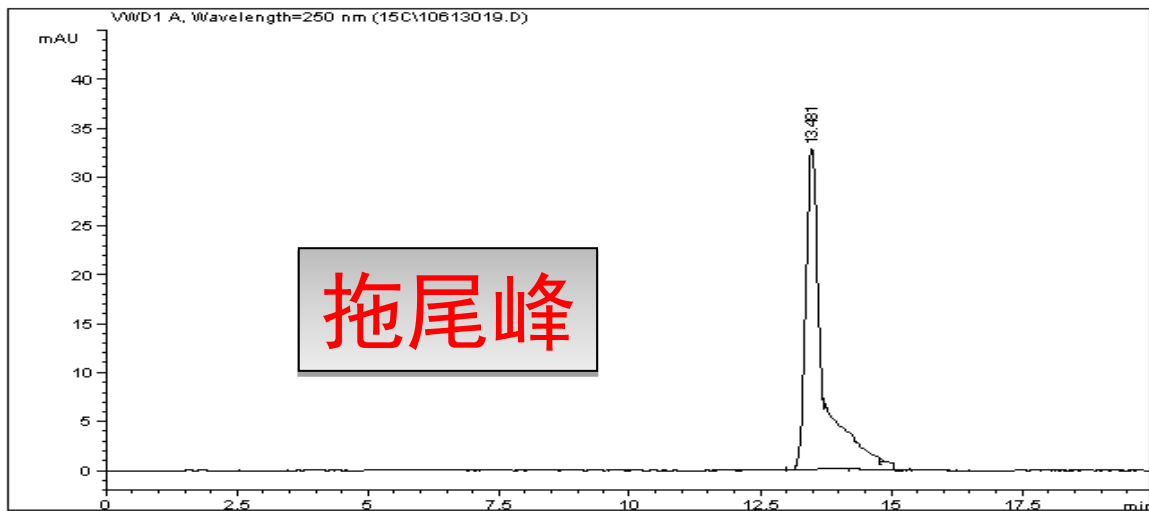
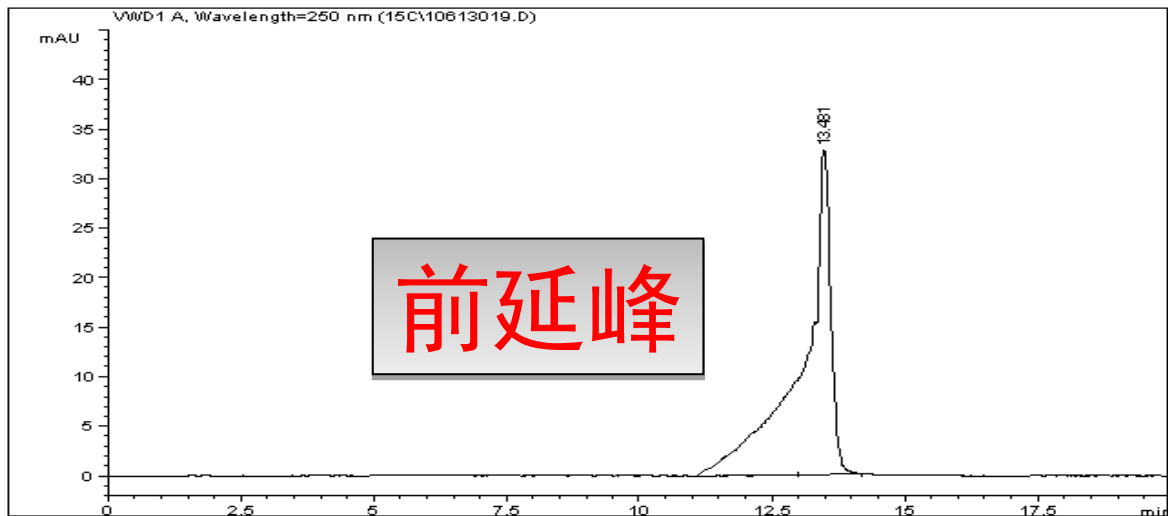


(三) 高效液相色谱法相关概念

3. 色谱峰--组分流经检测器时相应的连续信号产生的曲线。流出曲线上的突起部分。正常色谱峰近似于对称性正态分布曲线。不对称色谱峰有两种：前延峰和拖尾峰。

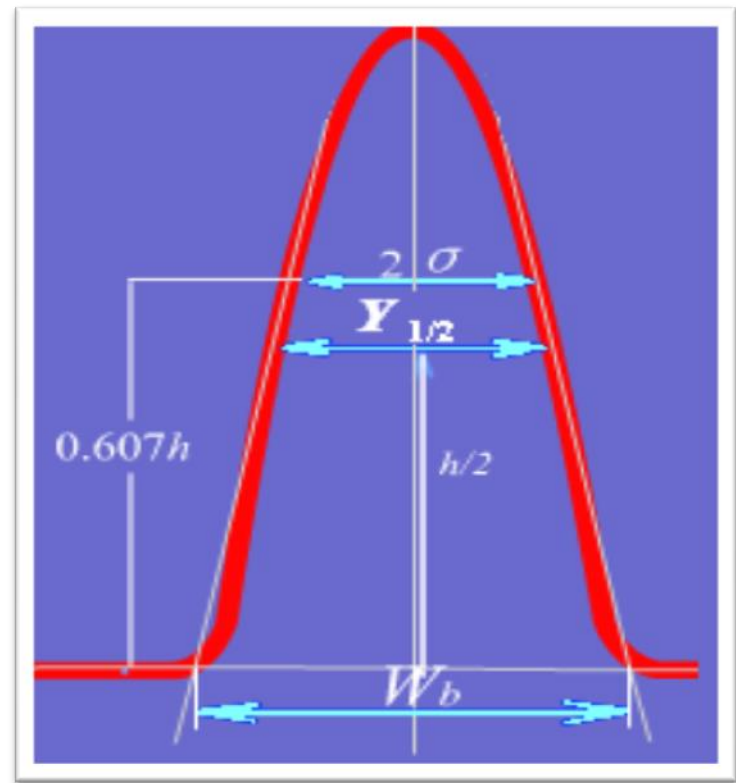


(三) 高效液相色谱法相关概念



(三) 高效液相色谱法相关概念

4. **峰宽** (W_b) ---峰两侧拐点处所作两条切线与基线的两个交点间的距离。
5. **半峰宽** ($W_{h/2}$) ---色谱峰高一半处的宽度。
6. **峰高** (h)
7. **峰面积** ---峰与峰底所包围的面积。
8. **保留时间** ---待测组分从进样到出现峰最大值所需的时间



(三) 高效液相色谱法相关概念

9. 固定相 (stationary phase) 和流动相 (mobile phase)

(1) 固定相 (填充剂) : 色谱柱由固定相与柱管组成



(三) 高效液相色谱法相关概念

9. 固定相和流动相

(2) 流动相：大部分采用混合溶剂系统

1) 极性流动相：如甲醇/水，乙腈/水，水和无机盐的缓冲液等。

有机相 $\leq 5\%$ ，否则柱效下降，色变系统不稳定。

2) 弱极性流动相：烃类溶剂，正相色谱系统的流动相常用两种或两种以上的有机溶剂，如二氯甲烷和正己烷等。

根据固定相与流动相的相对极性强弱，色谱法又分为：正相色谱法和反相色谱法两种



(三) 高效液相色谱法相关概念

反相色谱系统 ? (流动相极性大于固定相) →

一般采用非极性键合固定相，如硅胶- $C_{18}H_{37}$ （简称ODS或 C_{18} ），硅胶-苯基等；用强极性的溶剂为流动相，如**甲醇/水**，**乙腈/水**，水和无机盐的缓冲液等。结果极性大的组分先流出，极性小的组分后流出。

正相色谱系统 ? (流动相极性小于固定相)

一般采用极性键合固定相，如硅胶表面键合极性基团（**氰基**（-CN）、**氨基**（-NH₂）等；用弱极性的溶剂为流动相，如烃类溶剂（**正己烷**）。结果极性小的组分先流出，极性大的组分后流出。

还有：离子交换色谱和手性分离色谱



二、高效液相色谱法

（四）对仪器的一般要求和色谱条件

- 1.色谱柱：正相、反相、离子交换和手性分离色谱柱，根据被分离物质性质来选择，温度和pH会影响分离效果（柱温 $\geq 60^{\circ}\text{C}$ ）
- 2.检测器：有紫外-可见分光检测器、荧光、蒸发光散射检测器等
- 3.流动相：反相和正相

除**固定相种类**、**流动相组成**、**检测器类型**不得任意改变外，其余均可适当改变（如：流动相流速、混合流动相各组分的比例、柱温、进样量、检测器的灵敏度等）。以适应具体药品并达到系统适用性试验。

一般色谱图约20分钟内记录完毕。



二、高效液相色谱法

(五) 系统适用性试验

色谱系统的适用性试验通常包括五个参数。 ?

理论板数、分离度、灵敏度、拖尾因子和重复性

在进行色谱分析时，应按各品种正文项下要求对色谱系统进行适用性试验，检查色谱系统是否符合要求，必要时，可对色谱系统进行适当调整，以符合要求。

1. 色谱柱的**理论塔板数** (n) : 反映色谱系统的**分离效能** (即**柱效**)
(应不低于药品项下规定的最小理论塔板数)

$$n = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$



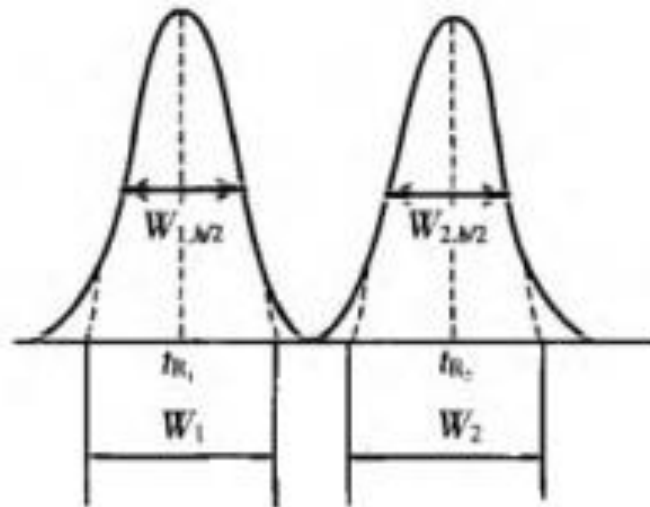
二、高效液相色谱法

(五) 系统适用性试验

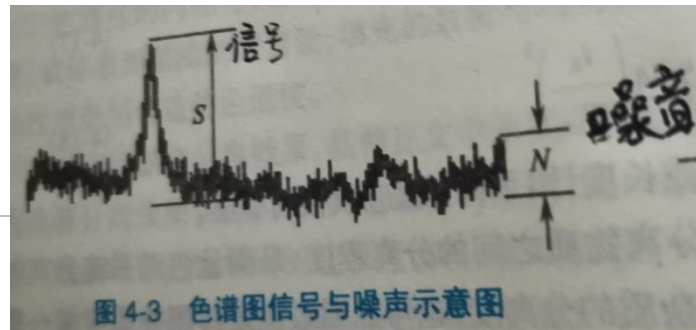
2.分离度 (R) - - 用于评价待测组分与相邻共存物或难分离物质之间的分离程度。

除另有规定外，待测组分与相邻共存物之间的分离度应**大于1.5**

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(W_1 + W_2) / 2} = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$



二、高效液相色谱法



(五) 系统适用性试验

3.灵敏度：用于评价色谱系统检测微量物质的能力，通常以信噪比来表示。定量测定时，信噪比 应不小于10；定性测定时，信噪比应不小于3。

(信噪比 S/N ：已知**低浓度试样**测出的信号与**空白样品**测出信号的比值，比值愈大愈灵敏)

4.拖尾因子 ($T_{0.95} \sim 1.05$)： $T = \frac{W_{0.05h}}{2d}$ 用于评价色谱峰的对称性

5.重复性：用于评价色谱系统连续进样时响应值的重复性能。采用外标法时，通常取各品种项下的对照品溶液，连续进样5次,峰面积的相对标准偏差应不大于**2.0%**)



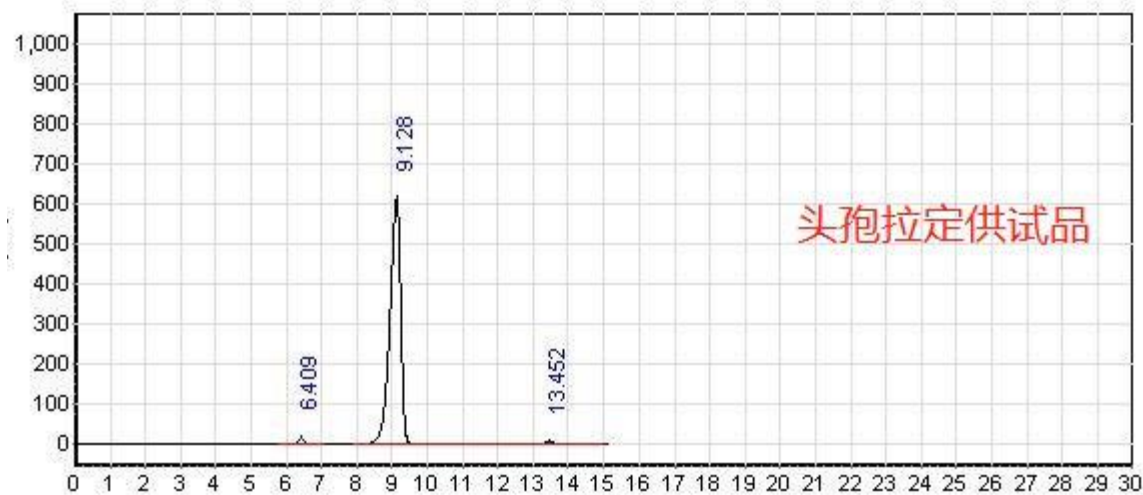
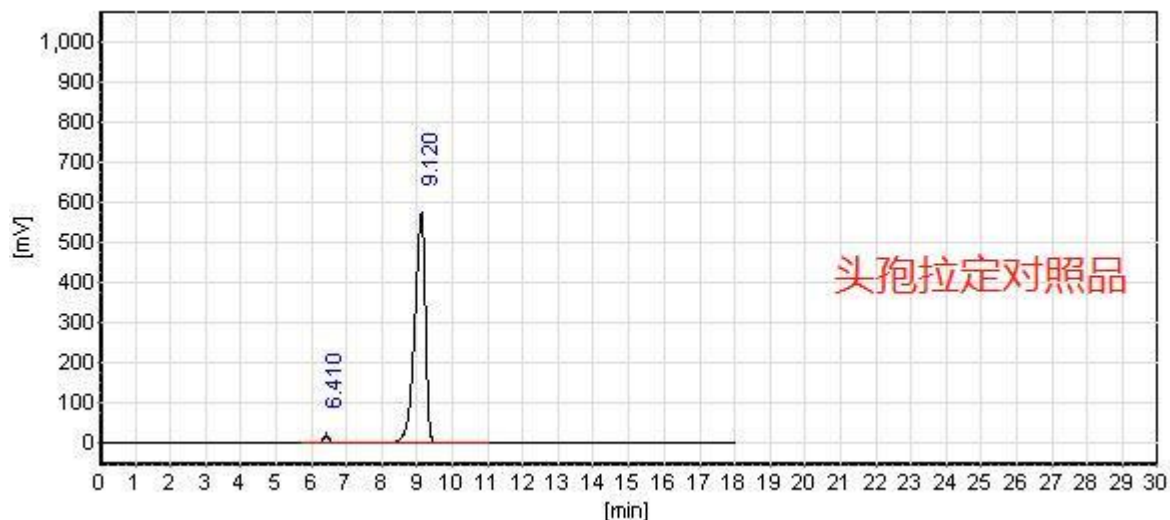
$$RSD = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\% = \frac{1}{\bar{X}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \times 100\%$$



二、高效液相色谱法

(六) 定性方法 (鉴别)

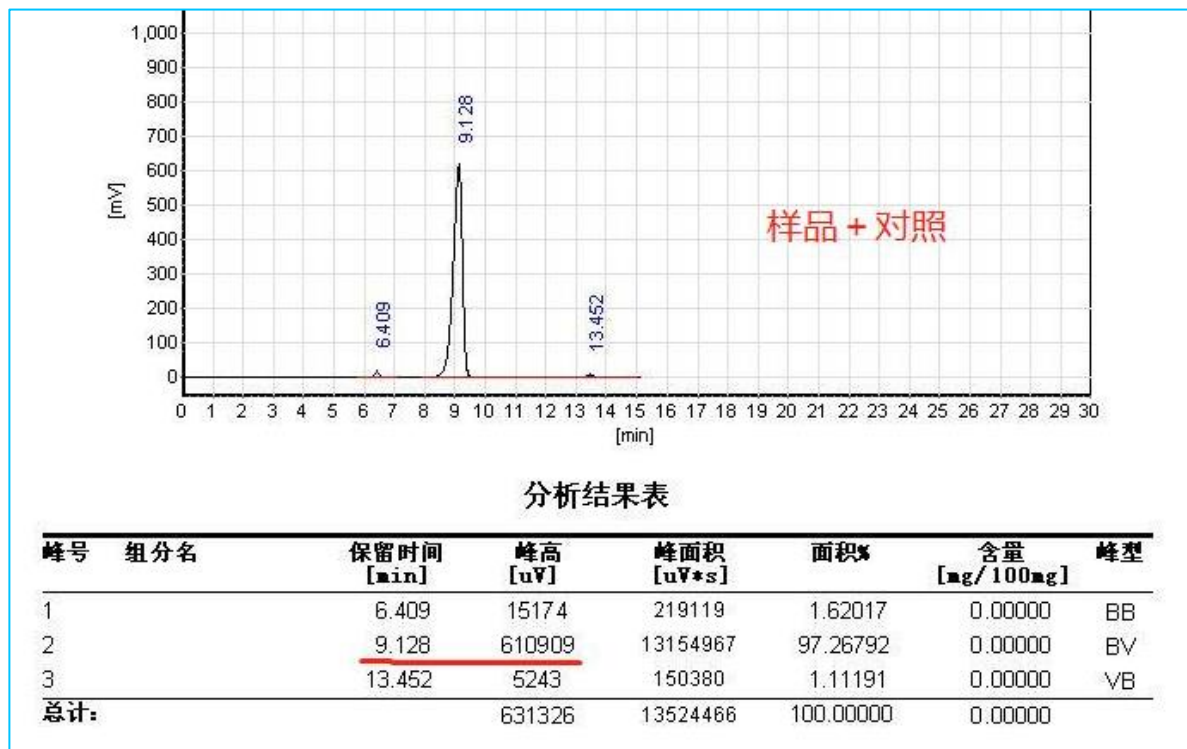
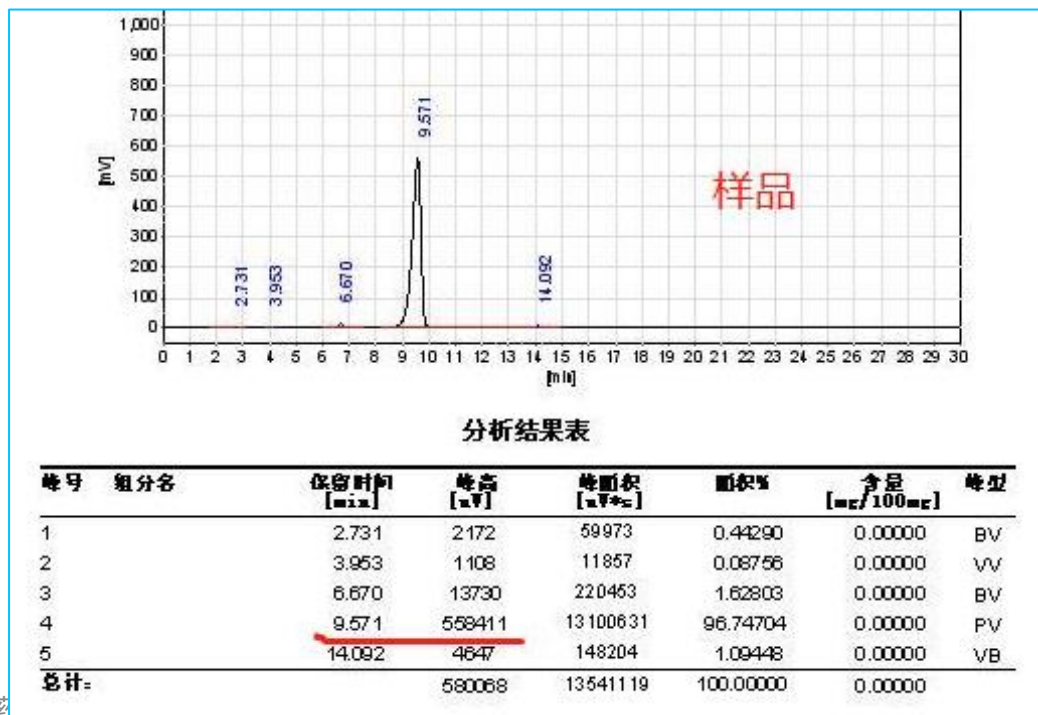
1. 与纯物质对比 在同一根柱上和相同条件下分别测定被测组分和被测组分的纯物质的保留值，若相同，则为同一物质。



二、高效液相色谱法

(六) 定性方法 (鉴别)

2. 加入纯物质增加峰高法 在试样中加入纯物质，如色谱图的某一组分的**峰高增加了**，则说明试样中含有该纯物质的这种组分。



二、高效液相色谱法

(七) 定量方法

定量依据：

在一定浓度范围内，被测物质的质量（浓度）与峰面积成正比。

$$m_R = f_R A_R, \quad m_S = f_S A_S, \quad m_X = f_X A_X$$

$$\text{或 } C_R = f_R A_R, \quad C_S = f_S A_S, \quad C_X = f_X A_X$$

C为质量浓度，m为质量， f_R 、 f_S 为对照品和内标物的相对校正因子，A为峰面积，S为内标物，R为对照品（为被测物质的纯物质），X为样品。

$$f = \frac{f_R}{f_S} = \frac{C_R / A_R}{C_S / A_S} = \frac{A_S / C_S}{A_R / C_R}$$

f 为相对校正因子，简称为校正因子



二、高效液相色谱法

(七) 定量方法

常用的有：**内标法和外标法**

1. 内标法

是一种间接或相对的校准方法。在分析测定样品中某组分含量时，加入一种**内标物质**以**校准和消除由于操作条件**（仪器稳定性、进样量等）的**波动**而对分析结果产生的影响，以提高分析结果的准确



(七) 定量方法

(1) 内标法

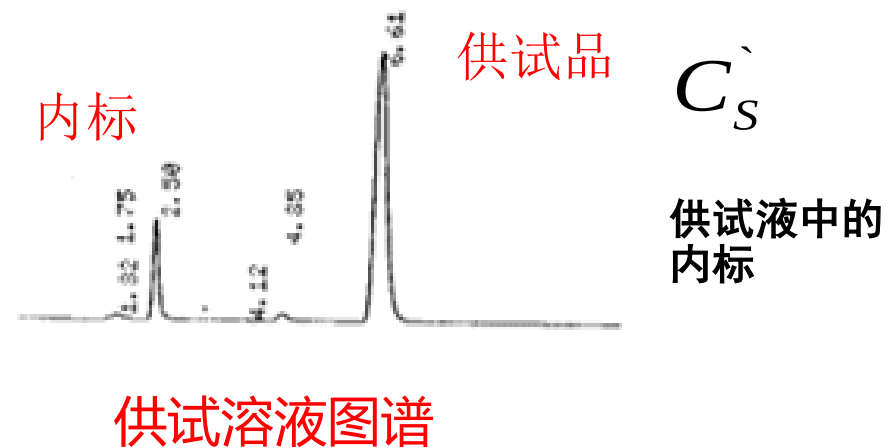
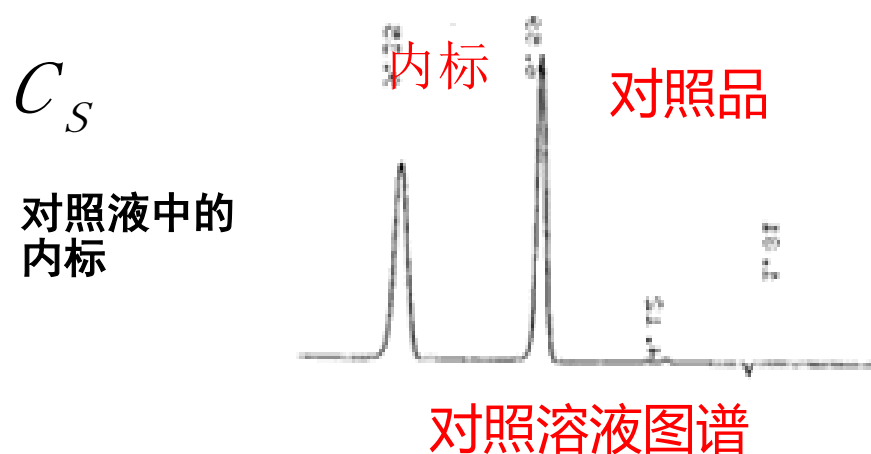
a) 配制对照品溶液 (测校正因子)

由对照品+内标物组成

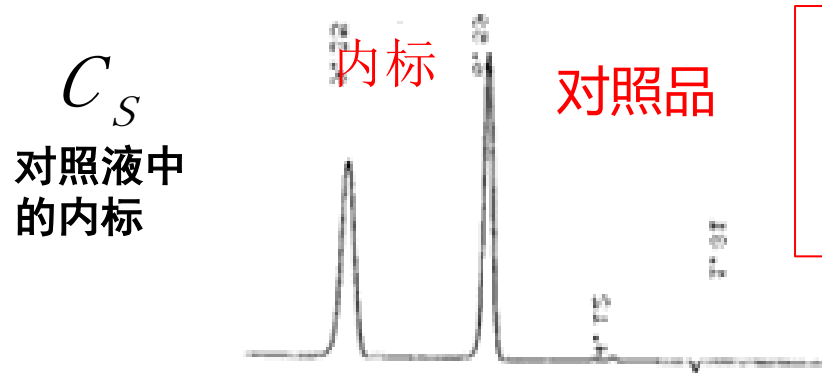
b) 配制供试品溶液

由样品+内标物组成，

a和b分别进样，得色谱图，记录峰面积 (A_S , A_R 、 A_S' A_X)。



(七) 定量方法



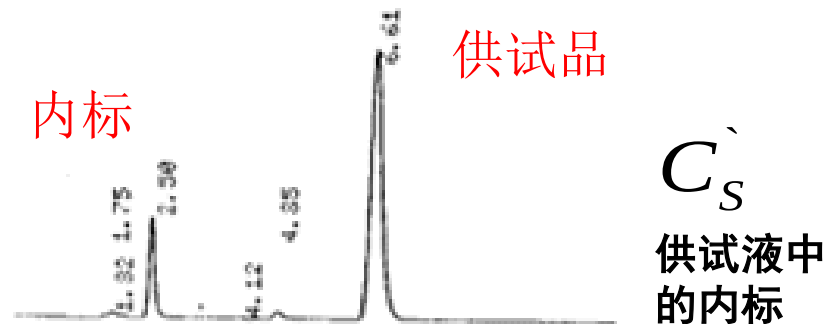
对照溶液图谱 (用于计算校正因子)

$$\text{含量}\% = \frac{m}{W} \times 100\% = \frac{C_x \times V_x \times D}{W} \times 100\%$$

$$f = \frac{f_X}{f'_S} = \frac{A'_S / C'_S}{A_X / C_X}$$

$$C_X = f \times \frac{A_X}{A'_S} \times C'_S$$

$$f = \frac{f_R}{f_S} = \frac{A_S / C_S}{A_R / C_R}$$



供试溶液图谱 (用于计算样品液的浓度)

$$f = \frac{f_X}{f'_S} = \frac{f_R}{f_S}$$

一般情况下：样品与对照是同一种物质；对照液中的内标和供试液中的内标是同一种物质

$$\text{含量}\% = \frac{f \times \frac{A_X}{A'_S} \times C'_S \times V_x \times D}{W} \times 100\%$$



(七) 定量方法

2. 外标法

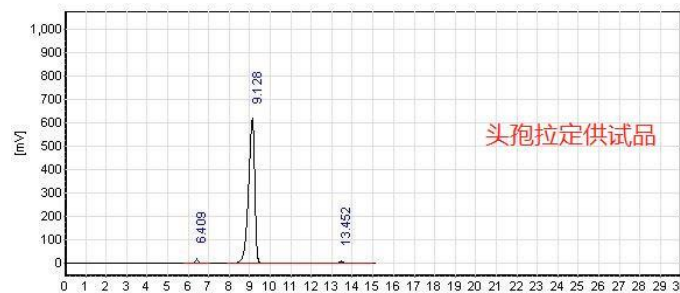
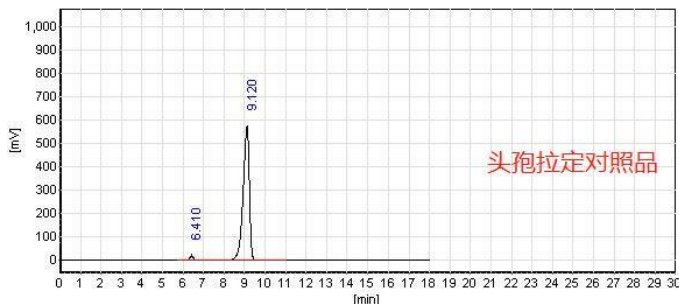
用待测组分的纯品作对照物质，以对照物质和样品中待测组分的响应信号相比较进行定量的方法称为外标法。

可分为工作曲线法及**外标一点法**等。

外标一点法：是用一种浓度的**对照品溶液**作对比，测定样品溶液中**X组分的含量**。将对照品溶液与样品溶液在相同条件下多次进样，测得**峰面积**的平均值，进行计算样品中X组分的含量



外标法：对照液和供试液分别进样，得到色谱图



计算依据 $C_R = f_R A_R$, $C_X = f_X A_X$ 注：供试品和对照品是同一种物质 $f_X = f_R$

$$\therefore \frac{C_X}{C_R} = \frac{f_R A_X}{f_R A_R}$$

$$\therefore C_X = C_R \times \frac{A_X}{A_R}$$

供试品溶液中含被测成份的浓度

$$\text{含量}\% = \frac{m}{W} \times 100\% = \frac{C_X \times V_X \times D}{W} \times 100\% = \frac{C_R \times \frac{A_X}{A_R} \times V_X \times D}{W} \times 100\%$$



(七) 定量方法

外标法：对照液和供试液分别进样

计算公式

(1) 原料药：

$$\text{样品}\% = \frac{m}{W} \times 100\% = \frac{C_X \times V_X \times D}{W} \times 100\% = \frac{C_R \times \frac{A_X}{A_R} \times V_X \times D}{W} \times 100\%$$

V_X ：为供试品初次配制的体积(ml)

D为稀释倍数

A_X 为供试品峰面积或峰高；

C_X 为供试品的浓度，

A_R 为对照品的峰面积或峰高

与内标比较

$$\text{含量}\% = \frac{f \times \frac{A_X}{A_S} \times c'_S \times V_X \times D}{W} \times 100\%$$



(七) 定量方法

对于制剂来说：含量限度的表示是用“**标示量的百分含量**”

$$\text{标示量}\% = \frac{\text{实际含量}}{\text{标示量}} \times 100\% = \frac{\text{每片实际含量}}{\text{标示量}} \times 100\% = \frac{\text{每支实际含量}}{\text{标示量}} \times 100\%$$

片剂

注射剂

(2) 片剂

$$\text{标示量}\% = \frac{C_R \times \frac{A_X}{A_R} \times V_X \times D \times \text{平均片重}}{W \times \text{标示量}} \times 100\%$$

$$\frac{C_R \times \frac{A_X}{A_R} \times V_X \times D}{W}$$

表示：每克供试品中含被测成份的量；或每克供试品中被测成份的实际含量

(3) 注射剂

$$\text{标示量}\% = \frac{C_R \times \frac{A_X}{A_R} \times D \times V_X \times \text{每支容量}}{V_S \times \text{标示量}} \times 100\%$$

$$\frac{C_R \times \frac{A_X}{A_R} \times V_X \times D}{V_S}$$

表示：每ml供试液中含被测成份的量；或每ml供试液中被测成份的实际含量

注：V_X通常等于V_S

• 示例：氨酚待因片（I）的含量测定

- 处方：对乙酰氨基酚500mg；磷酸可待因8.4mg/1000片
 - 20片，精密称定，研细，精密称取适量，250ml量瓶，加水溶解并稀释至刻度，滤过，取续滤液10μl进样；另精密称取磷酸可待因与对乙酰氨基酚对照品适量，加水溶解并定量稀释制成每1ml中约含磷酸可待因 0.03mg和对乙酰氨基酚 2mg的溶液，同法测定

$$\text{➤ 含量（毫克/片）} = \frac{C_R \times \frac{A_X}{A_R} \times D \times \overline{W}}{W}$$

$$\text{标示量\%} = \frac{C_R \times \frac{A_X}{A_R} \times V_X \times D \times \text{平均片重}}{W \times \text{标示量}} \times 100\%$$



(七) 定量方法

3.加校正因子的主成分自身对照法 (略)

4.不加加校正因子的主成分自身对照法 (略)

5.面积归一化法 (略)

按各品种项下的规定，配制供试品溶液，取一定量注入仪器，记录色谱图。测量各峰的面积和色谱图上除溶剂峰以外的总色谱峰面积，计算各峰面积占总峰面积的百分率。

高效液相色谱法的应用：鉴别、杂质检查和含量测定



1.用于衡量色谱峰是否对称的参数是

D

A.保留值

B.校正因子

C.峰宽

D.拖尾因子

E.分离度



2. 高效液相色谱法常用于进行鉴别的参数是

A

A. 保留值

B. 峰高

C. 半高峰宽

D. 理论板数

E. 比移植



检测(配合题)

- A. 色谱保留时间 B. 理论塔板数
C. 色谱峰高或峰面积 D. 拖尾因子 E. 重复性

3. 用于衡量柱效的参数是 B

4. 用于定量的参数是 C

5. 用于定性的参数是 A

6. 用于衡量峰型的参数是 D

7. 用于表示出峰快慢的参数是 A



检测(多选)

ABCD

8.色谱法的系统适用性试验一般要求

A.达到规定的理论板数

B.固定相和流动相比比例适当

C.分离度R应大于1.5

D.色谱峰拖尾因子T在0.95 ~ 1.05之间

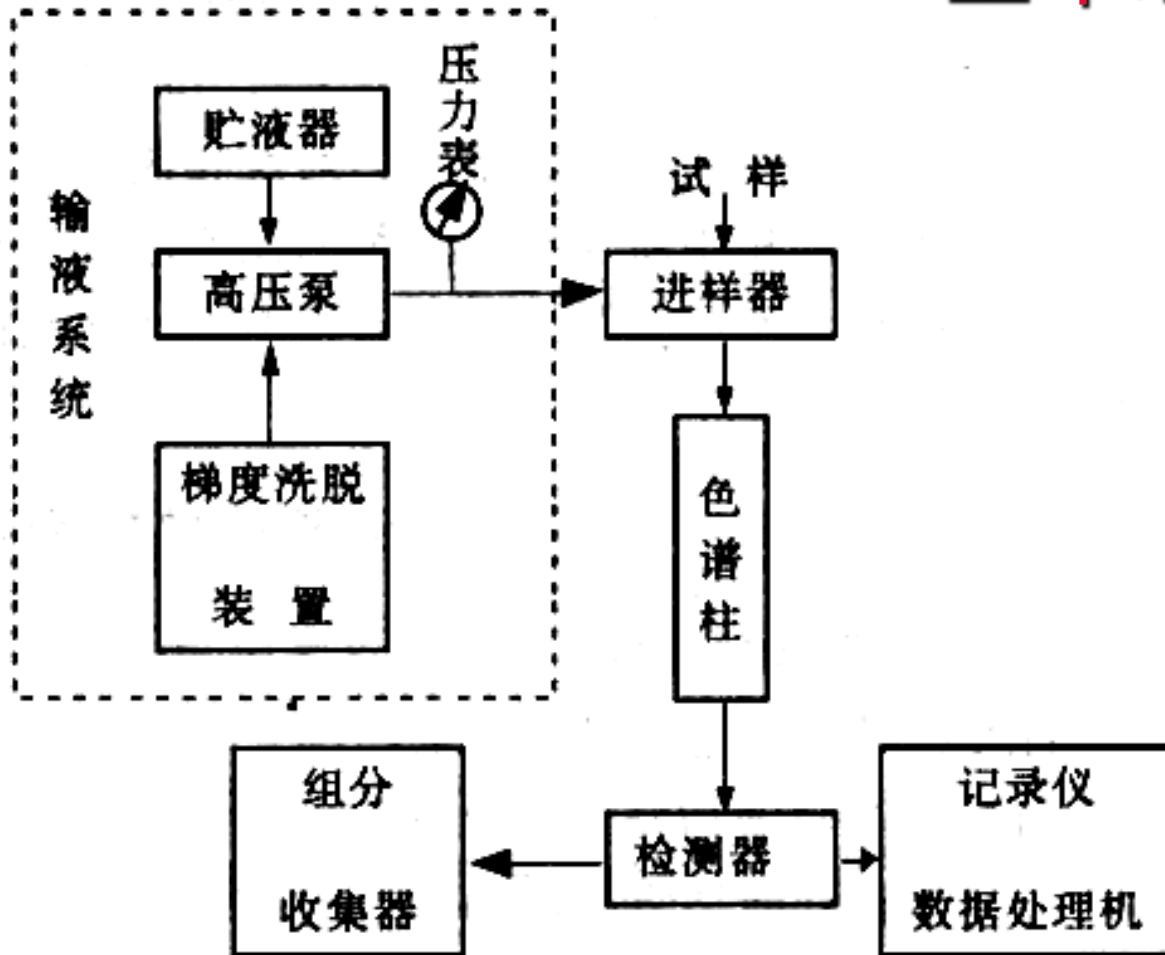
E.流动相的流速应大于1mL/min



三、高效液相色谱仪

流程图

基本组成



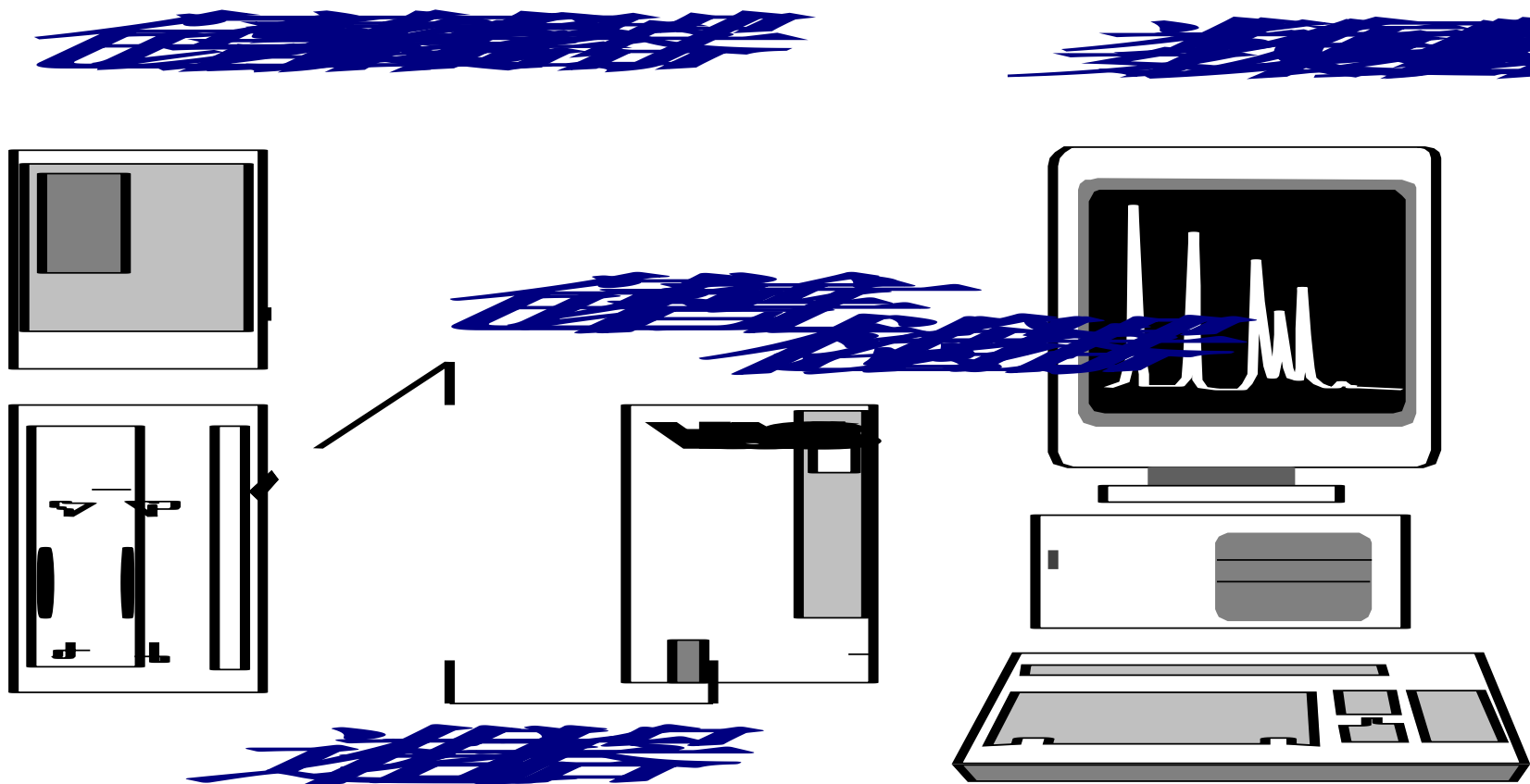
1. 贮液罐（滤棒，可滤去颗粒状物质）
2. 高压泵（输液泵）
3. 进样装置
4. 色谱柱——分离
5. 检测器——分析
6. 废液出口或组分收集器
7. 记录装置

图 19-4 高效液相色谱仪结构方块图



三、高效液相色谱仪

典型的仪器配置



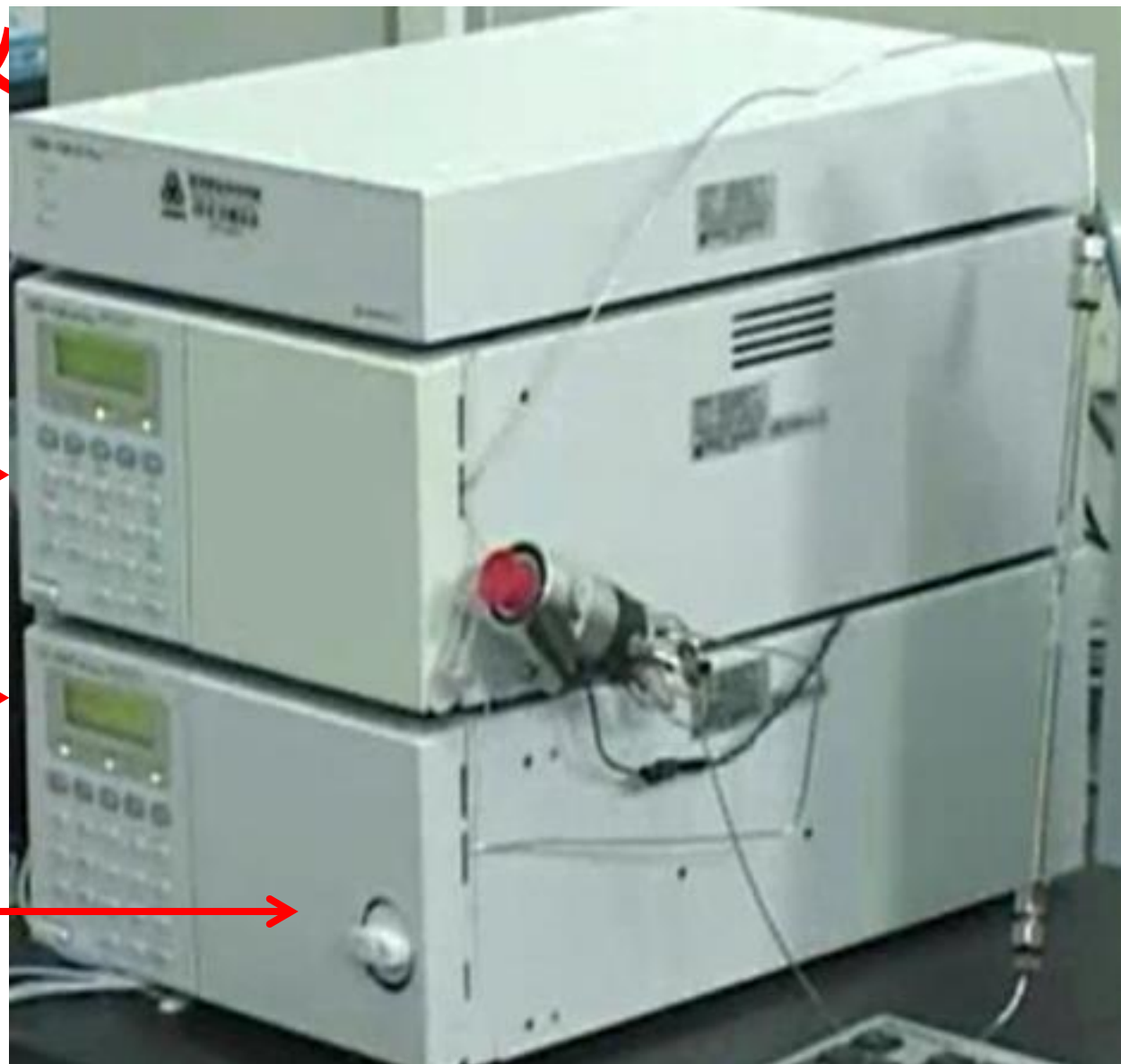
实训室中高效液相色谱仪的介绍

1. 岛津LC-10A高效液相色谱仪

检测器

单元泵

排气阀



实训室中高效液相色谱仪的介绍

2.岛津LC-16A高效液相色谱仪

控制面板

检测器

泵A

泵B

柱温箱



实训室中高效液相色谱仪的介绍

3. 安捷伦1260高效液相色谱仪

泵、脱气机
梯度组织器

自动进样器

检测器



1.反相高效液相色谱法常用的流动相是

A

A.乙腈-水

B.环己烷

C.乙醇-水

D.丙酮

E.三氯甲烷



2.在反相高效液相色谱法中，常用的固定相是

C

A.硅胶

B.氧化铝

C.十八烷基硅烷键合硅胶

D.甲醇

E.水



检测(多选)

ACDE

3.HPLC仪的主要部件有

A.高压输液泵

B.高压直流电

C.色谱柱

D.进样阀

E.检测器



检测(多选)

ABCD

4.高效液相色谱法的特点是

A.高柱效

B.高选择性

C.高灵敏度

D.分析速度快

E.可测定所有药物



四、高效液相色谱仪操作规程

(一) 操作前准备

1. 流动相的准备

试剂：析谱纯 水： 超纯水 调pH：用精密pH计

配好的流动相应通过0.45 μ m适宜的滤膜滤过,用前脱气,并配充足的流动相待用。

2. 供试液的配制

配好的供试液和对照液进样前应经0.45 μ m适宜的滤膜滤过,必要时样品液还要进行前处理,如提取净化、预过滤等。





四、高效液相色谱仪操作规程

(二) 操作步骤

1. 开机

打印机→计算机→泵电源 (POWER)

2. 排气



待主机稳定后，将排气阀 (DRAIN) 旋至打开位置 (open 方向 180°)，按冲洗键 (purge)，排气完毕，按冲洗键 (purge) (关)，旋关 DRAIN (向右旋 180°)。



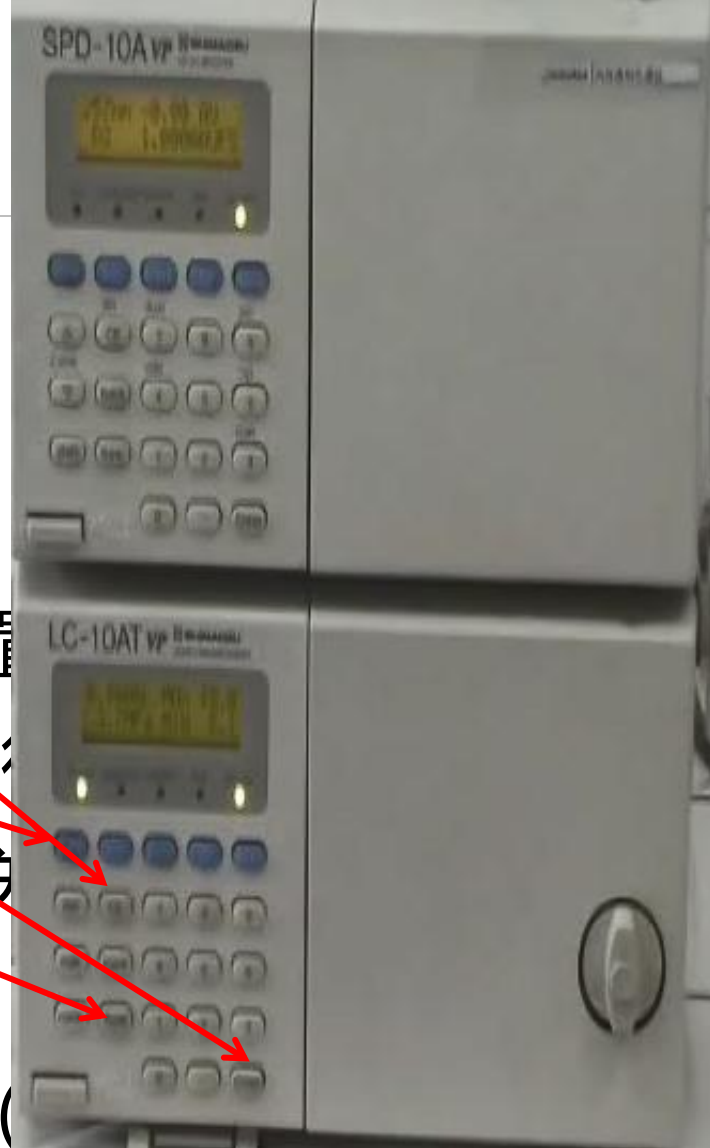
四、高效液相色谱仪操作规程

3. 跑基线（冲柱）

（1）按pump键

（2）设置参数：func（功能键）→流速→
最大压力（15）→最小压力（0.1）→Enter→CE,设置
注：流速要慢慢依次增加（0.2→0.4→0.6→0.8→1.0）
流动相，每次换流动相要依次减流速，并按pump键（关
流速要依次增加。

（3）开启检测器电源开关→自检完毕→设定参数（
（func→设定→Enter→CN）



四、高效液相色谱仪操作规程

(4) 查看基线 (打开工作站，把衰减调至0直至基线平稳。

4. 进样



- 1) 把进样器手柄放在载样位置 (LOAD)
- 2) 注射器吸样后要排气，把注射器的平头针直插至进样器的底部，注入供试溶液 (为定量环的3-5倍)
- 3) 校零→进样 (进样器手柄转至inject，定量环内供试液即被流动相带入流路)，停留在inject位置一段时间。



四、高效液相色谱仪操作规程

5. 收集色谱数据

- 1) 最后一峰出完后，应继续走一段时间，确定无组分流出色，方能结束记录。
- 2) 含量测定的对照液和样品液每份至少注样2次，由全部注样结果 ($n > 4$) 求得平均值，其相对标准偏差 (RSD) 应不大于 1.5%



四、高效液相色谱仪操作规程

6. 清洗和关机

- 1) 分析完毕→关检测器→关数据处理器→冲柱
(用甲醇冲30分钟, 如使用含盐流动相,
则先用10%甲醇水冲1h以上, 再用50%甲醇水冲
约20分钟, 再用甲醇冲1h以上)
- 2) 冲柱期间进样品也应用相应的溶剂冲洗,
- 3) 冲洗完毕后, 逐步降低流速至0, 关泵, 关电源, 登记。



岛津LC-10A(或16) 高效液相操作小结

(一) 操作前准备 (流动相 , 供试液和对照液)

(二) 操作步骤 :

开机→排气→跑基线→进样→收集色谱数据→清洗→关机



高效液相色谱法小结

1. 特点

2. 反相色谱的固定相和流动相 (**流动相极性大于固定相**)

3. 系统适应性试验

4. 定量方法 : (**外标法**)

$$\text{样品}\% = \frac{C_R \times \frac{A_X}{A_R} \times V_X \times D}{\text{样品量}} \times 100\%$$

5. 高效液相色谱仪的操作规程 (**了解, 以实训为主**)

甲硝唑虚拟操作视频及含量计算

操作步骤 :

开机→排气→跑基线→进样→收集色谱数据→清洗→关机)



高效液相色谱法测定甲硝唑注射液含量记录表格

称样量m对照品(mg)	12.5004	供试品取样V注射液(ml)	12.4457
稀释体积V对照品(ml)	100	稀释体积V稀释(ml)	100 V_X
保留时间tR对照品(min)	6.668	保留时间tR供试品(min)	6.668
峰面积A对照品	3232779	峰面积A供试品	3036986
进样量ul	10	进样量ul	10
浓度C对照品(mg/ml)	$C_R?$	浓度C供试品(mg/ml)	$C_X?$
含量限度(%)	99.0-101.0	供试品含量(%)	?
结论	选择结论		

$$C_X = C_R \times \frac{A_X}{A_R}$$

样品% = $C_R \times \frac{A_X}{A_R} \times V_X \times D$ / 样品量 × 100%

提交分析报告

甲硝唑虚拟操作小结

开机→排气→进样→清洗→关机→计算含量)

高效液相色谱法测定甲硝唑注射液含量记录表格

称样量m对照品(mg)	12.5004	供试品取样V注射液(ml)	12.4457
稀释体积V对照品(ml)	100	稀释体积V稀释(ml)	100
保留时间tR对照品(min)	6.668	保留时间tR供试品(min)	6.668
峰面积A对照品	3232779	峰面积A供试品	3036986
进样量ul	10	进样量ul	10
浓度C对照品(mg/ml)	0.125	浓度C供试品(mg/ml)	0.117
含量限度(%)	99.0-101.0	供试品含量(%)	94.01
结论	不符合要求		

$$\text{样品}\% = \frac{C_R \times \frac{A_X}{A_R} \times V_X \times D}{\text{样品量}} \times 100\% = \frac{0.117 \times 100 \times 1}{12.4457} \times 100\% = 94.01\%$$





隨身課堂

《药物分析》

高效液相色谱法

敬请关注下一节内容

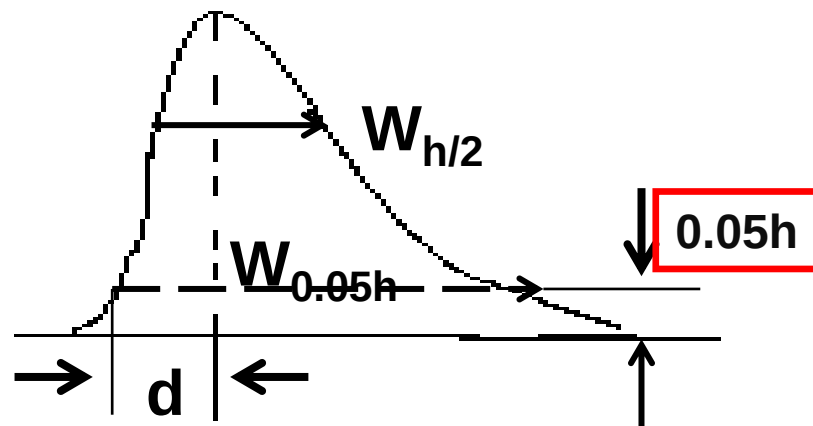
药物分析方法的验证



高效液相色谱法相关概念

4) 拖尾因子---,用以衡量色谱峰的对称性。也称为对称因子或不对称因子。

《中国药典》规定T应为**0.95 ~ 1.05**。T<0.95为前延峰，T>1.05为拖尾峰。



$$T = \frac{W_{0.05h}}{2d}$$

0.05峰高处的峰宽

峰顶点至峰前沿之间的距离



三、高效液相色谱法相关概念

5) **重复性** - 用于评价连续进样中，色谱系统响应值的重复性能。

采用**外标法**时，取对照溶液，连续进样**5次**，除另有规定外，其峰面积测量值的RSD应不大于**2.0%**。

采用**内标法**时，通常配制相当于**80%、100%和120%的对照品溶液**，加入规定量的内标溶液，配成**3种**不同浓度的溶液溶液，分别**至少进样2次**，计算平均校正因子，其相对**RSD应不大于2%**。

